



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

Indução de calos em *Cybistax antisiphilitica* (Mart.) Mart. e efeito de períodos e temperatura sobre a germinação de *Cybistax antisiphilitica* (Mart.) Mart., *Tabebuia impetiginosa* (Mart. Ex DC.) Standl. e *Tabebuia pentaphylla* Hemsl.

Thiago Simões

Orientadora: Prof^a, Dr^a. Ana Maria Viana

Florianópolis, Junho de 2009.

**Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas**

Indução de calos em *Cybistax antisiphilitica* (Mart.) Mart. e efeito de períodos e temperatura sobre a germinação de *Cybistax antisiphilitica* (Mart.) Mart., *Tabebuia impetiginosa* (Mart. Ex DC.) Standl. e *Tabebuia pentaphylla* Hemsl.

Thiago Simões

Orientadora: Prof^a, Dr^a. Ana Maria Viana

**Trabalho de conclusão de curso
Apresentado ao Curso de Ciências Biológicas
Referente à disciplina Estágio 2 BIO 5156**

Resumo

Estudos na área de Biotecnologia vêm permitindo uma ampla possibilidade para a conservação, utilização e proteção dos recursos florestais sendo de fundamental importância o desenvolvimento de estratégias apropriadas para melhoramento genético, manutenção e conservação de espécies. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de períodos e temperatura (0°C, -20°C, 5°C, -196°C, 25°C) sobre a conservação de sementes de *Cyristax antisiphilitica*, *Tabebuia impetiginosa* e *Tabebuia pentaphylla*, e desenvolver estudos sobre o efeito de diferentes concentrações de 2,4-D e de tipos de explantes sobre a indução e crescimento de calos de *C. antisiphilitica*.

A espécie *T. impetiginosa* após 8 meses de conservação não apresentou diferenças estatísticas na germinação das sementes conservadas no congelador, freezer, geladeira e nitrogênio líquido, mas as sementes mantidas em temperatura ambiente não germinaram.

As sementes de *T. pentaphylla* após 13 meses de conservação permaneceram viáveis nas condições freezer, geladeira e nitrogênio líquido.

A espécie *C. antisiphilitica* após 7 meses de conservação apresentou baixos índices de germinação para sementes conservadas em nitrogênio líquido e temperatura ambiente. A condição geladeira, induziu as maiores taxas de germinação sendo a mais indicada para manutenção da sua viabilidade. No estudo do efeito de tipos de explantes (hipocótilo, nó cotiledonar, cotilédones, nó foliar, folhas) sobre a indução e crescimento de calos de *C. antisiphilitica* pode-se observar que o crescimento dos calos em massa seca foi influenciado pelo tipo de explante utilizado e pelas concentrações de 2,4-D, sendo os explantes folha e cotilédone os que apresentaram as maiores massas secas. Estudos nesta área permitem a utilização das técnicas *in vitro* para a produção de biomassa em futuras pesquisas sobre análise de metabólitos secundários, além de permitir a utilização destes calos para desenvolver sistemas de regeneração de plantas e de embriogênese somática.

Sumário

1. Introdução.....	01
2. Objetivos.....	04
2.1. Objetivo Geral.....	04
2.2. Objetivos Específicos.....	05
3. Material e Métodos.....	05
3.1. Germinação das sementes.....	05
3.1.2. Material vegetal.....	05
3.1.3. Determinação do teor de água das sementes.....	05
3.1.4. Condições de armazenamento.....	06
3.1.5. Germinação das sementes.....	06
3.2. Indução de calos.....	06
3.2.1. Material Vegetal.....	07
3.2.2. Desinfecção das sementes.....	07
3.2.3. Preparação dos meios de cultura.....	07
3.2.4. Estabelecimento de plântulas axênicas e condições de crescimento das culturas.....	07
3.2.5. Efeito de tipos de explantes e de diferentes concentrações de 2,4-D sobre o crescimento dos calos.....	08
3.3. Análise estatística.....	08
4. Resultados.....	09
4.1. Germinação de sementes de <i>C. antisiphilitica</i>	09
4.1.1. Teor de água das sementes no início dos experimentos.....	09
4.1.2. Efeito da imersão das sementes em nitrogênio líquido.....	09
4.1.3. Efeito de tipos de armazenamento por 7 meses.....	10
4.2. Germinação de sementes de <i>T. impetiginosa</i>	12
4.2.1. Teor de água das sementes no início dos experimentos.....	12
4.2.2. Efeito da imersão das sementes em nitrogênio líquido.....	13
4.2.3. Efeito de tipos de armazenamento por 8 meses.....	14
4.3. Germinação de sementes de <i>T. pentaphylla</i>	15
4.3.1. Teor de água das sementes no início dos experimentos.....	15
4.3.2. Efeito de tipos de armazenamento por 3 meses.....	16

4.3.3. Efeito de tipos de armazenamento por 6 meses.....	17
4.3.4. Efeito de tipos de armazenamento por 13 meses.....	18
4.4. Indução e crescimento de calos.....	19
4.4.1. Efeito do tempo em hipoclorito de sódio sobre a germinação.....	19
4.4.2. Germinação <i>in vitro</i>	20
4.4.3. Efeito de tipos de explantes e de concentrações de 2,4-D sobre a indução e o crescimento de calos.....	21
5. Discussão e Conclusão.....	23
7. Referências bibliográficas.....	28

Lista de Figuras

Figura 1. Porcentagem de germinação em função do tempo de sementes imersas em nitrogênio líquido por 1 hora e controle de *C. antisiphilitica*. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos ao nível de 5% pelo teste t.....10

Figura 2. Porcentagem de germinação em função do tempo de sementes de *C. antisiphilitica* armazenadas em congelador (CG), freezer (FZ), geladeira (GL), nitrogênio líquido (NL) e temperatura ambiente (TA), durante 7 meses. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste Tukey ao nível de 5%.....11

Figura 3. Porcentagem de germinação em função do tempo de sementes de *C. antisiphilitica* armazenadas em geladeira (GL) e nitrogênio líquido (NL) durante 7 meses. Letras similares não indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos ao nível de 5% pelo teste t.....12

Figura 4. Porcentagem de germinação em função do tempo de sementes de *T. impetiginosa* para controle e imersas em nitrogênio líquido por 1 hora. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos ao nível de 5% pelo teste t.....13

Figura 5. Porcentagem de germinação em função do tempo de sementes de *T. impetiginosa* armazenadas em congelador (CG), freezer (FZ), geladeira (GL) e nitrogênio líquido (NL), durante 8 meses. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste Tukey ao nível de 5%.....15

Figura 6. Porcentagem de germinação em função do tempo de sementes de *T. pentaphylla* armazenadas em congelador (CG), freezer (FZ), geladeira (GL), nitrogênio líquido (NL) e temperatura ambiente (TA), durante 3 meses. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste Tukey ao nível de 5%.....17

Figura 7. Porcentagem de germinação em função do tempo de sementes de *T. pentaphylla* armazenadas em freezer (FZ), geladeira (GL) e nitrogênio líquido (NL), durante 13 meses. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste Tukey ao nível de 5%.....18

Figura 8. Germinação uniforme de sementes de *T. pentaphylla* armazenadas durante 13 meses em geladeira. Atingiram estabilidade já na segunda contagem.....19

Figura 9. Porcentagem de germinação em função do tempo de sementes de *C. antisiphilitica* imersas em hipoclorito por 15 e 30 minutos. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos ao nível de 5% pelo teste T.....20

Figura 10. Porcentagem de germinação *In vitro* em função do tempo de sementes de *C. antisiphilitica* imersas em hipoclorito por 20 minutos.....20

Figura 11. Indução de calos em explantes de *C. antisiphilitica* após seis semanas de cultivo em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,4-D. 1-Folha, 2-Cotilédone, 3-Controle.....23

Lista de Tabelas

Tabela 1. Teor de água de sementes de <i>C. antisiphilitica</i> no momento de montagem dos experimentos.....	09
Tabela 2. Teor de água de sementes de <i>C. antisiphilitica</i> armazenadas em geladeira e temperatura ambiente por 7 meses.....	10
Tabela 3. Teor de água de sementes de <i>T. impetiginosa</i> no momento de montagem dos experimentos.....	13
Tabela 4. Teor de água de sementes de <i>T. impetiginosa</i> , armazenadas em geladeira e temperatura ambiente por 8 meses.....	14
Tabela 5. Teor de água de sementes de <i>T. pentaphylla</i> no momento de montagem dos experimentos.....	15
Tabela 6. Teor médio de água de sementes de <i>T. pentaphylla</i> , armazenadas em geladeira e temperatura ambiente por 3 meses.....	16
Tabela 7. Dados de germinação de sementes de <i>T. pentaphylla</i> armazenadas em congelador (CG), freezer (FZ), geladeira (GL), nitrogênio líquido (NL) e temperatura ambiente (TA), durante 6 meses.....	17
Tabela 8. Efeito de tipos de explantes e de concentrações de 2,4-D sobre a indução de calos de <i>C. antisiphilitica</i> cultivados, por 6 semanas, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido.....	21
Tabela 9. Efeito de tipos de explantes e de concentrações de 2,4-D sobre a massa seca e o teor de água de calos de <i>C. antisiphilitica</i> cultivados, por 6 semanas, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido.....	22

1. Introdução

Segundo Capobianco (2002), a Mata Atlântica é considerada como um dos mais ricos conjuntos de ecossistemas em termos de diversidade biológica do Planeta. Este bioma é composto de uma série de fitofisionomias bastante diversificadas, o que propiciou uma significativa diversificação ambiental e, como consequência, a evolução de um complexo biótico de natureza vegetal e animal altamente rico.

Uma das características mais marcantes da Mata Atlântica do Sul do Brasil consiste, sobretudo, no grande número de espécies características e exclusivas (espécies endêmicas) que a compõem e cujos valores nas espécies lenhosas (árvores, arvoretas e arbustos) superam 50% (Klein, 1990).

No entanto, cinco séculos de ocupação reduziram a Mata Atlântica a pequenas manchas que se concentram na região Sul/Sudeste. O extrativismo, que teve início com a exploração do Pau-brasil (*Caesalpinia echinata*), expandindo-se posteriormente para madeiras como Caviúna (*Dalbergia nigra*), Ipês (*Tabebuia spp.*), Cedro (*Cedrela spp.*), Copaíba (*Copaifera spp.*), Jacarandá (*Machaerium spp.*), Canelas (*Ocotea spp.*), Vinhático (*Plathymenia spp.*), Palmito (*Euterpe edulis*), Xaxim (*Cyathea spp.*) etc. A agricultura de subsistência e mais recentemente a especulação imobiliária podem ser apontadas como as principais causas desta drástica redução da Mata Atlântica. (Joly, 1991).

Segundo Myers (1988), as florestas brasileiras são fontes de origem de inúmeros subprodutos de grande importância econômica e de biomoléculas muito utilizadas em indústrias que podem ainda servir de modelo para síntese de novas moléculas.

Estudos na área de Biotecnologia vêm permitindo uma ampla possibilidade para a conservação, utilização e proteção dos recursos florestais. O desenvolvimento de estratégias apropriadas para melhoramento genético, manutenção e conservação de espécies nativas *in situ* e *ex situ* exigem informações sobre os sistemas reprodutivos, fluxo genético em populações, ecologia, conservação das sementes, cultura de tecidos, marcadores genéticos entre outras (Haynes, 1994).

As Bignoniáceas representam uma família de ampla distribuição nas regiões tropicais de todo o mundo, especialmente freqüentes nos trópicos americanos. São plantas lenhosas, arbustivas ou arbóreas e também trepadeiras (Joly, 1977).

Compreende esta família cerca de 120 gêneros, 800 espécies, sendo *Tabebuia* o gênero mais representativo com cerca de 100 espécies (Judd et al., 1999).

No Brasil ocorrem cerca de 50 gêneros e 350 espécies muitas delas com grande importância ecológica, ornamental, medicinal e madeireira (Souza & Lorenzi, 2005).

A espécie *Tabebuia impetiginosa* possui altura de 8-12m, tronco de 60-90cm de diâmetro. Folhas compostas 5-folioladas; folíolos coriáceos, pubescentes em ambas as faces, de 9-18cm de comprimento por 4-10cm de largura. Seu fruto é do tipo cápsula e pode chegar até 40cm de comprimento. Sementes com 4-5cm de comprimento e pequena ala. Ocorre no Piauí, Ceará até Minas Gerais, Goiás e São Paulo, tanto na mata pluvial atlântica como na floresta semidecídua, sendo ocasionalmente encontrada no cerrado.

Planta decídua durante o inverno, característica das florestas semidecíduas e pluvial. Apresenta ampla dispersão, porém descontínua em toda sua área de distribuição. Ocorre tanto no interior da floresta primária, como nas formações secundárias. Já é uma das espécies de Ipê-roxo mais cultivada para arborização urbana no centro oeste do país, é também ótima para compor reflorestamento com fins ecológicos (Lorenzi, 2002).

Uma revisão da tribo Tecomae de A.H. Gentry considera a espécie *T. avellanadae* como sendo a mesma que *T. impetiginosa*.

Segundo Lorenzi (2002), as espécies *T. avellanadae*, *T. impetiginosa* e *T. serratifolia* possuem características, propriedades e usos similares.

A literatura etnobotânica cita o uso das cascas da planta na medicina popular sob a forma de chá como anti-infeccioso, antifúngico, diurético, adstringente, no tratamento caseiro do impetigo e contra alguns tipos de câncer, de lupus, doença de Parkinson, psoríase e alergias. Os resultados de sua análise fitoquímica registram como componentes da madeira naftoquinonas, principalmente o lapachol, a lapachona e alguns de seus derivados. Embora a madeira não tenha uso medicamentoso popular, delas

foram isoladas, além do lapachol, o lapachenol, a quercetina e o ácido hidroxibenzóico. Várias substâncias isoladas destas plantas, principalmente o lapachol, têm apresentado nos ensaios farmacológicos atividade antineoplásica, atividade antimicrobiana contra bactérias do gênero *Brucella*, atividade contra penetração de cercárias de *Schistosoma mansoni*, e ainda, ação anticoagulante, sendo notável sua ação antiinflamatória, comparável a da fenilbutasona (Lorenzi, 2002).

A espécie *Cybistax antisyphilitica* possui altura de 6-12m com tronco de 30-40cm de diâmetro. Folhas compostas 5-folioladas, sustentadas por pecíolo de 15-20cm. Folíolos de tamanhos variados (7-18cm de comprimento). Fruto tipo cápsula podendo atingir 25cm. Sementes aladas, com alas de até 5 vezes o tamanho do embrião. Ocorre na região Amazônica até o Rio Grande do Sul em várias formações florestais, é particularmente freqüente no cerrado.

Planta decídua, pioneira, característica de formações vegetais abertas, como cerrados e cerradões. Sua ocorrência no interior da floresta primária densa é rara. Prefere solos arenosos e pedregosos onde a drenagem é rápida

A árvore pelo porte e coloração distinta de suas flores é ótima para o paisagismo, principalmente para arborização de ruas estreitas. Como planta pioneira não deve faltar no reflorestamento de áreas de preservação permanente (Lorenzi, 2002).

Alguns compostos desta espécie já foram avaliados com excelente atividade antimicrobiana, como é o caso dos triterpenos. Esta substância inibiu atividade de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, bactérias gram + e gram -, porém não apresentando potencial fungicida. (Ramos et al., 2003).

Outra substância comum aos outros ipês, o Lapachol, extraído da casca de *C. antisyphilitica*, teve sua atividade avaliada contra larvas de *A. aegypti*, causando inibição no desenvolvimento (Rodrigues et.al., 2005). A biotecnologia vegetal, através das técnicas de cultura in vitro de células, pode ser uma importante ferramenta para os estudos sobre os metabólitos secundários, não tendo sido detectados, na literatura científica, estudos com este enfoque sobre esta espécie.

A espécie *Tabebuia pentaphylla* possui altura de 15-20m, originária de El Salvador, de tronco robusto, com casca levemente fissurada longitudinalmente, com estrias claras e lenticelas esparsas. Folhas grandes decíduas e semi-

decíduas, compostas 5-folioladas. Inflorescências terminais densas em panículas volumosas. Fruto tipo cápsula, deiscente com numerosas sementes aladas. Planta muito ornamental pelo intenso florescimento, é freqüente na arborização de parques, ruas e avenidas, por ser rústica e de rápido crescimento (Lorenzi, 2003).

Segundo Lorenzi (2002) A germinação das sementes de Ipês quando armazenadas possuem pequena viabilidade não ultrapassando três meses.

Pela importância das espécies e da curta longevidade natural de suas sementes, pesquisas envolvendo o armazenamento das sementes de ipês vêm sendo desenvolvidas (Maeda & Matthes, 1984, Mello & Eira, 1995, Cunha et al., 1992, Degan et al. 2001 e Cabral et al., 2003).

A forma mais comum de conservação *ex situ* é a de sementes, já que esta é a unidade de propagação natural para a maioria das espécies de plantas superiores (Santos, 2001). Este procedimento tem a função básica de preservar a qualidade das sementes, diminuindo a velocidade de deterioração, conseguindo que estas, após certo período, ainda apresentem elevada qualidade fisiológica (Villela & Peres, 2004).

Para que a conservação das sementes seja realizada de forma adequada é necessário que se conheça as características ecofisiológicas das mesmas. Além disso, o estudo do comportamento das sementes durante o armazenamento também é de fundamental importância uma vez que, quando conservadas por determinados períodos e condições, podem perder sua capacidade germinativa (Oliveira et al., 2006).

Estudos sobre os processos fisiológicos e a otimização das condições de armazenamento das sementes são, efetivamente, o ponto de partida para estabelecer, de forma racional, estratégias de conservação e exploração de germoplasma das espécies nativas (Cabral et al., 2003).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivos avaliar o efeito de períodos e temperaturas (0°C, -20°C, 5°C, -196°C, 25°C) sobre a conservação de

sementes de *Cybistax antisiphilitica*, *Tabebuia impetiginosa* e *Tabebuia pentaphylla*, e desenvolver estudos sobre o efeito de concentrações de 2,4-D e de tipos de explantes sobre a indução e crescimento de calos de *C. antisiphilitica* para estudos sobre metabólitos secundários.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Determinar o teor de água das sementes antes e após os períodos de armazenamento.

2.2.2. Determinar a viabilidade das sementes, através de testes de germinação, após períodos de armazenamento em congelador (0°C), freezer (-20°), geladeira (5°C), nitrogênio líquido (196°C) e temperatura ambiente (25°C).

2.2.3. Testar o efeito de tipos de explantes (hipocótilo, nó cotiledonar, cotilédones, nó foliar, folhas) sobre a indução e crescimento de calos de *C. antisiphilitica*.

3. Materiais e Métodos

3.1. Germinação das sementes

3.1.2. Material vegetal

Para a realização deste trabalho foram utilizadas sementes de *Cybistax antisiphilitica* e *Tabebuia impetiginosa* obtidas da Empresa Flora Tietê Associação de Recuperação Florestal – Penápolis/SP e sementes de *Tabebuia pentaphylla* do Instituto Florestal de São Paulo - São Paulo/SP.

3.1.3. Determinação do teor de água das sementes

O teor de água das sementes foi determinado no momento da montagem dos experimentos de germinação, logo que chegaram ao laboratório e após os períodos de armazenamento. As sementes foram pesadas em balança de precisão, para ser avaliada a massa fresca e em seguida foram colocadas em estufa para secar, por um período de 16 horas a 103°C. Após, novamente foram pesadas para a determinação da massa seca (Reed et al., 2001).

O teor de água foi expresso em porcentagem (%) da massa fresca (Bewley & Black, 1994).

3.1.4. Condições de armazenamento

As sementes foram armazenadas nas condições: congelador (0°C), freezer (-20°C), geladeira (5°C), nitrogênio líquido (-196°C) e temperatura ambiente (25°C). Para o armazenamento a -196°C as sementes foram separadas em pequenos envelopes de papel alumínio, contendo 25 sementes cada, e em seguida, imersas diretamente em nitrogênio líquido. Para as demais condições as sementes foram armazenadas em placas de Petri vedadas com filme de PVC. Para cada tratamento foram armazenadas 5 repetições de 25 sementes cada.

3.1.5. Germinação das sementes

As sementes foram removidas das condições de armazenamento e colocadas para germinar em embalagens de polietileno com dimensões de 18 cm x 12 cm x 5 cm, sobre duas folhas de papel toalha embebidas com 40 ml de água destilada. As sementes mantidas em nitrogênio líquido foram removidas desta condição e expostas à temperatura ambiente, por 30 minutos (descongelamento lento), antes de serem colocadas para germinar nas condições acima.

Os experimentos foram mantidos em câmara de crescimento com temperatura (25±2°C), sob Lâmpadas Fluorescentes Phillips TDL, com fluxo de fótons de 22,3 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e umidade relativa de 70%. As porcentagens de germinação das sementes foram avaliadas em intervalos de dois dias. Foram utilizadas 5 repetições de 25 sementes cada por tratamento.

3.2. Indução de calos

3.2.1. Material Vegetal

Neste trabalho foram utilizadas sementes e plântulas axênicas de *C. antisiphilitica*, das quais foram removidos os explantes para realização dos experimentos. As sementes foram adquiridas da Empresa Flora Tietê Associação de Recuperação de Florestal – Penápolis/SP na data 10/08/08.

3.2.2. Desinfecção das sementes

As sementes, após serem lavadas abundantemente com água corrente, foram desinfetadas em condições assépticas, utilizando-se uma solução comercial de hipoclorito de sódio (Q-Boa) com 2.5% (v/v) de cloro ativo, acrescida de algumas gotas de detergente neutro, por 20 minutos. Posteriormente, as sementes foram lavadas cinco vezes com água destilada esterilizada e inoculadas em meio de cultura.

3.2.3. Preparação dos meios de cultura

O meio de cultura utilizado em todos os experimentos foi o de Murashige & Skoog (Murashige & Skoog, 1962), preparação comercial em pó, produzida pela Sigma Chemical Co., suplementado com sacarose (58,4 mM), Phytigel (2 g/L). O pH do meio foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem, pela adição de NaOH 0.1 M ou HCl 0.1 N. Os meios de cultura foram distribuídos em tubos de ensaio (25 x 150 mm), na quantidade de 8 mL/tubo. Os tubos foram fechados com tampas de polipropileno. A autoclavagem foi realizada por 18 minutos a 1.1 Kgf/cm², em temperatura de 121°C.

3.2.4. Estabelecimento de plântulas axênicas e condições de crescimento das culturas

As sementes desinfectadas foram inoculadas em meio de cultura Murashige & Skoog, suplementado com sacarose e Phytigel nas concentrações citadas no item 3.2.3. Os tubos de ensaio foram cobertos com filme de polipropileno (76 mm x 76 mm), presos com elásticos de borracha. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob fotoperíodo de 16 horas, provido por lâmpadas fluorescentes Philips TDL ($22.3 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e umidade relativa de 70%.

3.2.5. Efeito de tipos de explantes e de concentrações de 2,4-D sobre o crescimento dos calos

Neste experimento foram utilizados como explantes, segmentos de 1 cm de comprimento de hipocótilos, nós cotiledonares, nós foliares e segmentos de 1 cm de comprimento por 0,5 cm de largura de cotilédones e folhas. Os explantes foram removidos de plântulas de 9 meses, germinadas *in vitro* e inoculados em tubos de ensaio, contendo o meio de cultura descrito no item 3.2.3., suplementado com ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) nas concentrações de 0, 0,25, 0,5. As culturas foram mantidas nas condições descritas no item 3.2.4. O crescimento das culturas foi avaliado 6 semanas após o início do experimento, através da determinação da, massa fresca e massa seca dos calos e do teor de água.

3.3. Análise estatística

Todos os experimentos foram montados seguindo-se o delineamento estatístico completamente casualizado. Os resultados foram analisados ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o teste t, quando a comparação se restringiu a apenas dois tratamentos, ou a Análise de Variância (ANOVA), com separação das médias pelo Teste de Tukey, ao nível de 5%, para comparação de mais de dois tratamentos. Os dados de germinação foram transformados em arcoseno $\sqrt{\%}$ antes de serem submetidos aos testes estatísticos (Gómez & Gómez, 1984).

4. Resultados

4.1. Germinação de sementes de *C. antisiphilitica*

4.1.1. Teor de água das sementes no início dos experimentos

O teor médio de água das sementes no início dos experimentos foi de $6,63 \pm 0,27\%$ da massa fresca (Tabela 1).

Tabela 1. Teor de água de sementes de *C. antisiphilitica* no momento de montagem dos experimentos.

Repetição	Teor de água (% MF)
1	6,90
2	6,26
3	6,67
4	6,71
Média \pm DP	$6,63 \pm 0,27$

MF= massa fresca

4.1.2. Efeito da imersão das sementes em nitrogênio líquido

A Figura 1 ilustra as porcentagens de germinação, no decorrer do tempo, dos tratamentos controle e imersão em nitrogênio líquido. Verifica-se que a germinação, em ambos os tratamentos teve início ao redor de 10 dias após a montagem do experimento. Os resultados da Figura 1 indicam que ao final do experimento não foram observadas diferenças estatísticas entre o tratamento de imersão em nitrogênio líquido e controle. As porcentagens máximas de germinação obtidas foram de 45,6% e 44% para sementes do controle e do nitrogênio líquido, respectivamente.

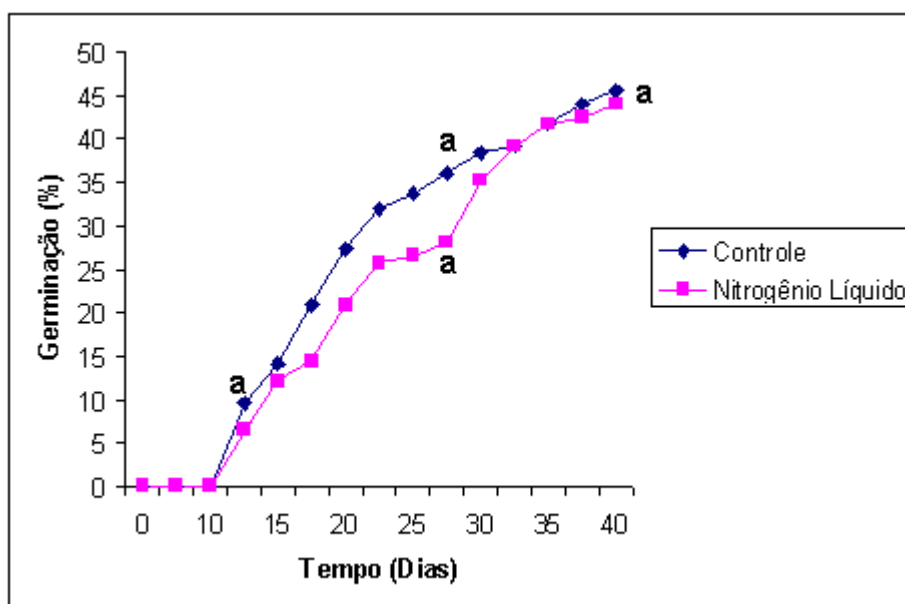


Figura 1. Porcentagem de germinação em função do tempo de sementes de *C. antisiphilitica* imersas em nitrogênio líquido por 1 hora e controle. Letras similares não indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos ao nível de 5% pelo teste t.

4.1.3. Efeito de tipos de armazenamento por 7 meses

4.1.3.1. Efeito sobre o teor de água das sementes

Com relação ao teor de água, os resultados da Tabela 2 indicam que os maiores teores de água de 6,63% e 7,30% foram observados, respectivamente, nas sementes do controle (sementes não armazenadas cujo teor de água foi determinado no início dos experimentos) e nas armazenadas em temperatura ambiente, mas as diferenças entre esses dois tratamentos não foram significativas. Diferenças significativas no teor de água foram detectadas entre as sementes armazenadas em geladeira e em temperatura ambiente, indicando aumento no teor de água, após sete meses de armazenamento.

Tabela 2. Teor de água de sementes de *C. antisiphilitica* armazenadas em geladeira e temperatura ambiente por 7 meses.

Tipo de armazenamento	Teor de água (%MF) ^a
Controle	6,63±0,27 ab
Geladeira	6,17±0,24 a
Temperatura ambiente	7,30±0,63 b

^aMédias de 4 repetições seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%. MF= massa fresca.

4.1.3.2. Efeito sobre a germinação

A Figura 2 indica que, após 7 meses de armazenamento em congelador, freezer, geladeira, nitrogênio líquido e temperatura ambiente, os valores máximos de germinação foram de 45,6%, 48%, 63,2%, 20% e 40,8% respectivamente, havendo diferenças significativas entre os mesmos. As maiores taxas de germinação foram observadas nas condições geladeira, congelador e freezer, apesar de apresentarem pequenas diferenças significativas ao longo do experimento. As condições temperatura ambiente e nitrogênio líquido apresentaram os resultados mais baixos de germinação, mostrando diferenças significativas em relação aos demais tratamentos desde o início do experimento.

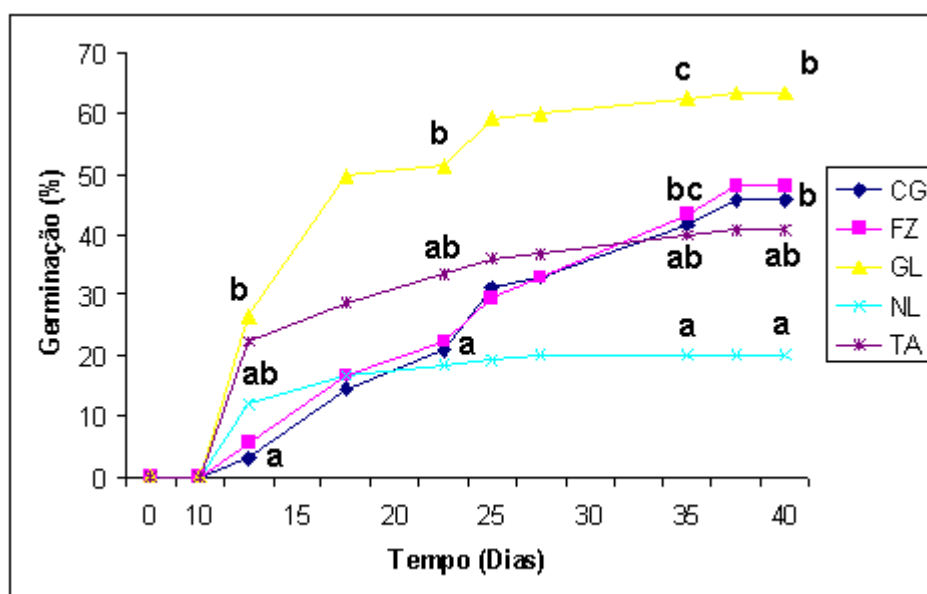


Figura 2. Porcentagem de germinação em função do tempo de sementes de *C. antisiphilitica* armazenadas em congelador (CG), freezer (FZ), geladeira (GL), nitrogênio líquido (NL) e temperatura ambiente (TA), durante 7 meses. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste Tukey ao nível de 5%.

Como o resultado da germinação das sementes conservadas em nitrogênio líquido apresentou diferenças significativas, um novo teste de germinação foi realizado para confirmar os resultados, utilizando-se as sementes conservadas na geladeira, pelo mesmo período de tempo como controle. A Figura 3 mostra que, apesar de no início do experimento não haver diferenças estatísticas entre os tratamentos, as sementes conservadas em geladeira apresentaram 40% de germinação, diferindo significativamente dos 14% obtidos para as sementes conservadas em nitrogênio líquido, no final do experimento.

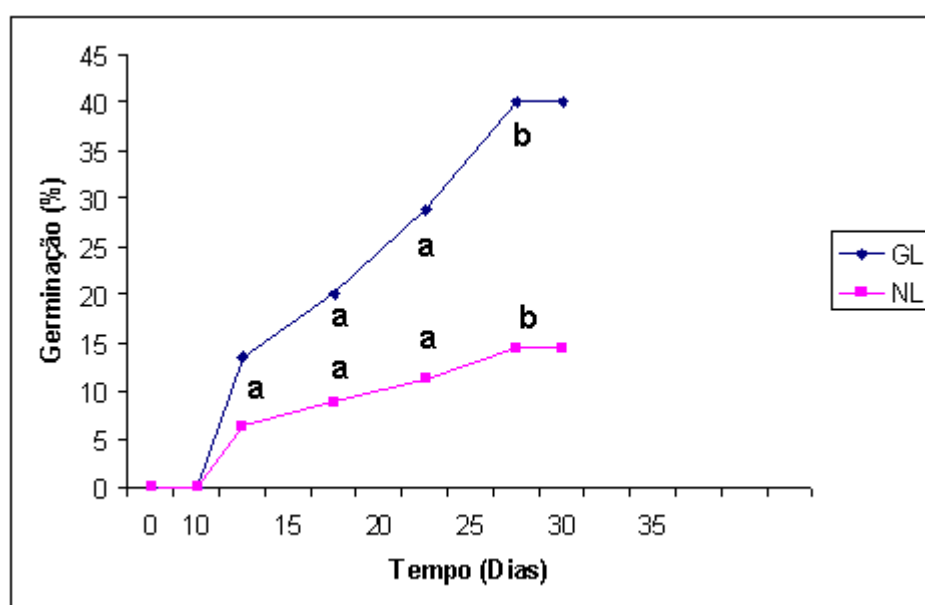


Figura 3. Porcentagem de germinação em função do tempo de sementes de *C. antispythitica* armazenadas em geladeira (GL) e nitrogênio líquido (NL) durante 7 meses. Letras similares não indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos ao nível de 5% pelo teste t.

4.2. Germinação de sementes de *T. impetiginosa*

4.2.1. Teor de água das sementes no início dos experimentos

Os resultados da Tabela 3 indicam que o teor de água das sementes no início dos experimentos foi de 7,56% da massa fresca.

Tabela 3. Teor de água de sementes de *T. impetiginosa* no momento de montagem dos experimentos.

Repetição	Teor de água (% MF)
1	7,30
2	7,86
3	7,31
4	7,77
Média±DP	7,56±0,29
MF= massa fresca	

4.2.2. Efeito da imersão das sementes em nitrogênio líquido

Os resultados da Figura 4 indicam que ao final do experimento não foram observadas diferenças estatísticas entre as taxas de germinação do tratamento de imersão em nitrogênio líquido e do controle. Apenas na primeira contagem houve diferença entre os valores de germinação, pois as sementes mantidas no nitrogênio líquido apresentaram uma germinação superior. Os valores máximos obtidos foram de 64,8%, para sementes do controle e 66,4%, para o nitrogênio líquido.

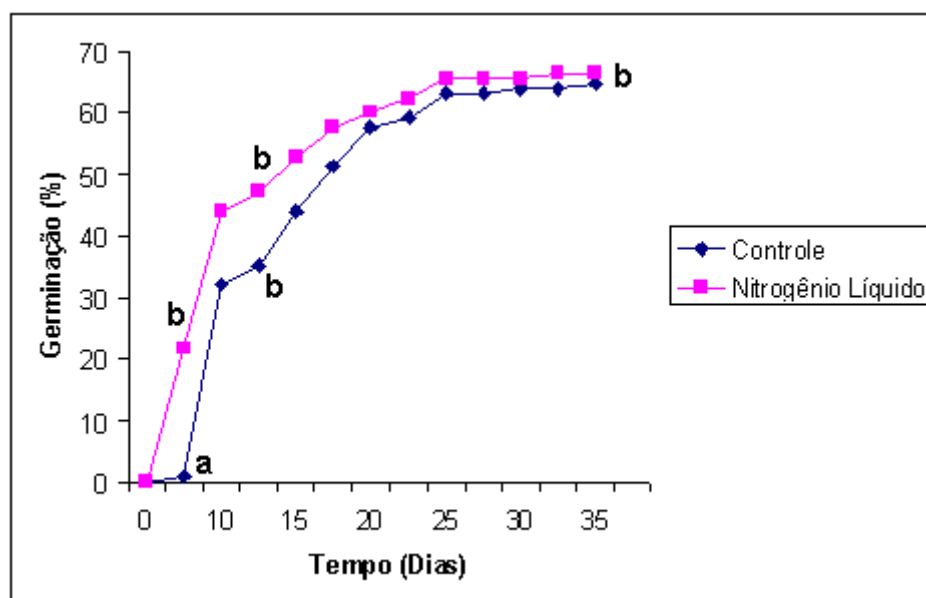


Figura 4. Porcentagem de germinação em função do tempo de sementes de *T. impetiginosa* para controle e imersas em nitrogênio líquido por 1 hora. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos ao nível de 5% pelo teste t.

4.2.3. Efeito de tipos de armazenamento por 8 meses

4.2.3.1. Efeito sobre o teor de água das sementes

A Tabela 4 apresenta os teores de água das sementes, no início dos experimentos (controle) e após 8 meses de armazenamento em geladeira e temperatura ambiente. Os resultados indicam diferenças significativas entre todos os tratamentos sendo que o armazenamento em temperatura ambiente ocasionou um aumento significativo no teor de água das sementes em relação às demais condições.

Tabela 4. Teor de água de sementes de *T. impetiginosa*, armazenadas em geladeira e temperatura ambiente por 8 meses.

Tipo de Armazenamento	Teor de água (%MF) ^a
Controle	7,56±0,29 a
Geladeira	9,25±0,46 b
Temperatura ambiente	10,28±0,24 c

^aMédias de 4 repetições seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%. MF= massa fresca.

4.2.3.2. Efeito sobre a germinação

A Figura 5 indica que, após oito meses de armazenamento em congelador, freezer, geladeira e nitrogênio líquido os valores máximos de germinação foram de 63,2%, 66,4%, 69,6%, 52,8%, respectivamente, não havendo diferenças significativas entre os mesmos em nenhuma fase do experimento. Nenhuma das sementes que foram armazenadas em temperatura ambiente germinou (dados não apresentados na Figura 5).

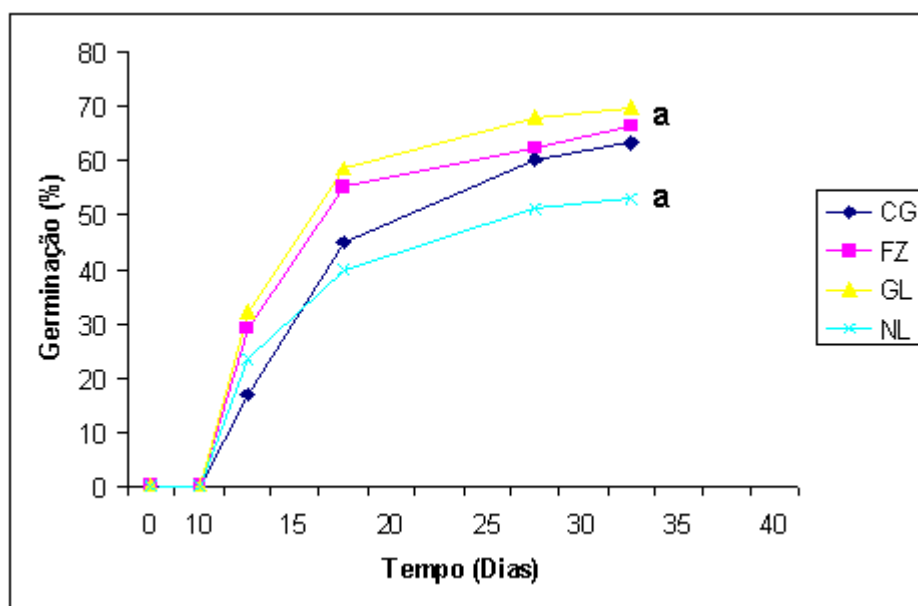


Figura 5. Porcentagem de germinação em função do tempo de sementes de *T. impetiginosa* armazenadas em congelador (CG), freezer (FZ), geladeira (GL) e nitrogênio líquido (NL), durante 8 meses. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste Tukey ao nível de 5%.

4.3. Germinação de sementes de *T. pentaphylla*

4.3.1. Teor de água das sementes no início dos experimentos

Os resultados da Tabela 5 indicam que o teor médio de água das sementes no início dos experimentos foi de 7,14% da massa fresca.

Tabela 5. Teor de água de sementes de *T. pentaphylla* no momento de montagem dos experimentos.

Repetição	Teor de água (% MF)
1	7,14
2	7,20
3	7,06
4	7,18
Média±DP	7,14±0,06

MF= massa fresca

4.3.2. Efeitos de tipos de armazenamento por 3 meses

4.3.2.1. Efeito sobre o teor de água das sementes armazenadas em geladeira

A Tabela 6 apresenta os teores médios de água das sementes, no início dos experimentos (controle) e após 3 meses de armazenamento em geladeira. Os resultados indicam diferenças significativas entre os tratamentos sendo que o armazenamento em geladeira ocasionou uma diminuição significativa no teor de água das sementes.

Tabela 6. Teor médio de água de sementes de *T. pentaphylla*, armazenadas em geladeira e temperatura ambiente por 3 meses.

Tipo de Armazenamento	Teor de água (%MF) ^a
Controle	7,14±0,06 b
Geladeira	5,64±0,16 a

^a Médias de 4 repetições seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste t ao nível de 5%. MF= massa fresca.

4.3.2.2. Efeito sobre a germinação

Os resultados da Figura 6 indicam que os valores máximos de germinação das sementes armazenadas por 3 meses em congelador (84,8%), freezer (92,8%), geladeira (88,8%) e nitrogênio líquido (90,4%) não diferiram significativamente entre si, mas foram significativamente maiores do que o obtido para as sementes armazenadas em temperatura ambiente (41,6%). Estas diferenças foram observadas em todos os tempos do experimento. As primeiras sementes que germinaram foram as armazenadas em geladeira que já na primeira contagem (ao redor de cinco dias após o início do experimento) apresentavam 72,8% de germinação.

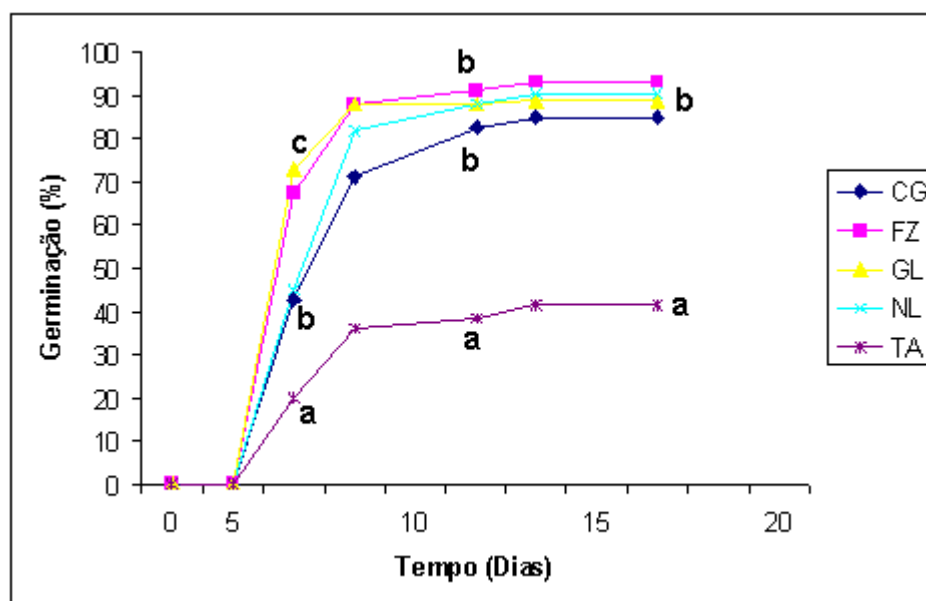


Figura 6. Porcentagem de germinação em função do tempo de sementes de *T. pentaphylla* armazenadas em congelador (CG), freezer (FZ), geladeira (GL), nitrogênio líquido (NL) e temperatura ambiente (TA), durante 3 meses. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste Tukey ao nível de 5%.

4.3.3. Efeitos de tipos de armazenamento por 6 meses

Os resultados da Tabela 7 indicam que as condições freezer, geladeira e nitrogênio líquido apresentaram as maiores taxas de germinação diferindo significativamente dos tratamentos congelador e temperatura ambiente que apresentaram apenas 25,6% e 8,0% de germinação respectivamente.

Tabela 7. Dados de germinação de sementes de *T. pentaphylla* armazenadas em congelador (CG), freezer (FZ), geladeira (GL), nitrogênio líquido (NL) e temperatura ambiente (TA), durante 6 meses.

Tratamento	Germinação (%) ^a
Congelador	25,6 a
Freezer	95,2 b
Geladeira	91,2 b
Nitrogênio Líquido	88,0 b
Temperatura ambiente	8,0 a

^a Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste Tukey ao nível de 5%.

4.3.4. Efeitos de tipos de armazenamento por 13 meses

Os resultados da Figura 7 indicam que após 13 meses de armazenamento em congelador, freezer, geladeira, nitrogênio líquido e temperatura ambiente os valores máximos de germinação das sementes de *T. pentaphylla* foram 0%, 88%, 92%, 93,6% e 0%, respectivamente. Os tratamentos freezer, geladeira e nitrogênio líquido não diferiram significativamente em nenhum dos demais tempos analisados. As sementes armazenadas em congelador e temperatura ambiente não germinaram (dados não apresentados na Figura 7). As primeiras sementes que germinaram foram as armazenadas em geladeira, que atingiram o máximo de germinação já na segunda contagem (Figura 7). A Figura 8 ilustra a uniformidade na germinação dessas sementes.

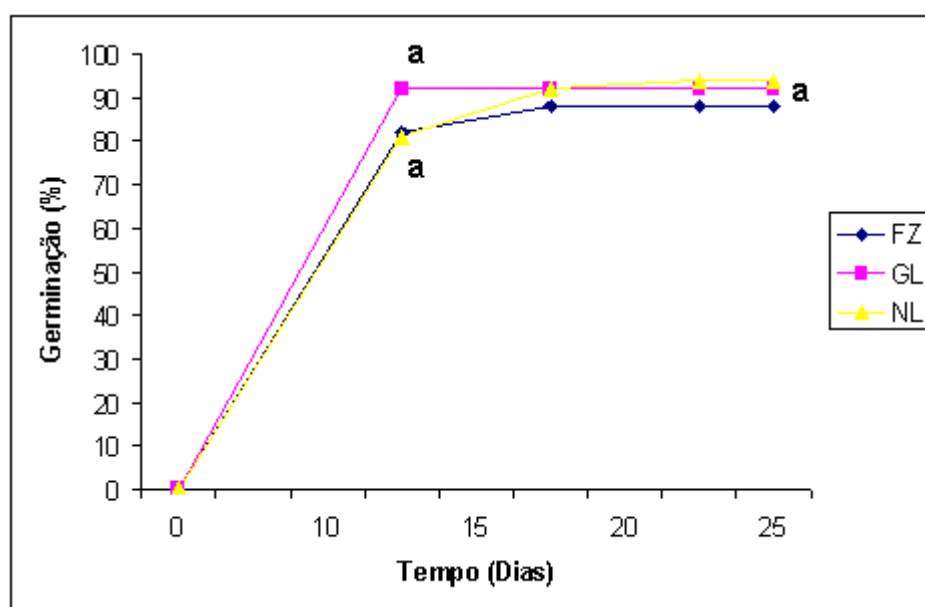


Figura 7 Porcentagem de germinação em função do tempo de sementes de *T. pentaphylla* armazenadas em freezer (FZ), geladeira (GL) e nitrogênio líquido (NL), durante 13 meses. Letras similares não indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste Tukey ao nível de 5%.



Figura 8. Germinação uniforme de sementes de *T. pentaphylla* armazenadas durante 13 meses em geladeira. Atingiram taxas máximas de germinação já na segunda contagem.

4.4. Indução e crescimento de calos

4.4.1. Efeito do tempo de imersão em hipoclorito de sódio sobre a germinação

A Figura 9 mostra que a imersão das sementes de *C. antisiphilitica* por 15 e 30 minutos em solução de hipoclorito de sódio comercial, contendo 2% de cloro ativo, provocou diferenças significativas na germinação das sementes durante quase todo o decorrer do experimento. Até os primeiros 15 dias as diferenças não foram significativas, mas a partir desta data as taxas de germinação das sementes imersas por apenas 15 minutos no hipoclorito foram sempre maiores atingindo o máximo de 44% contra 25,3% das sementes imersas por 30 minutos.

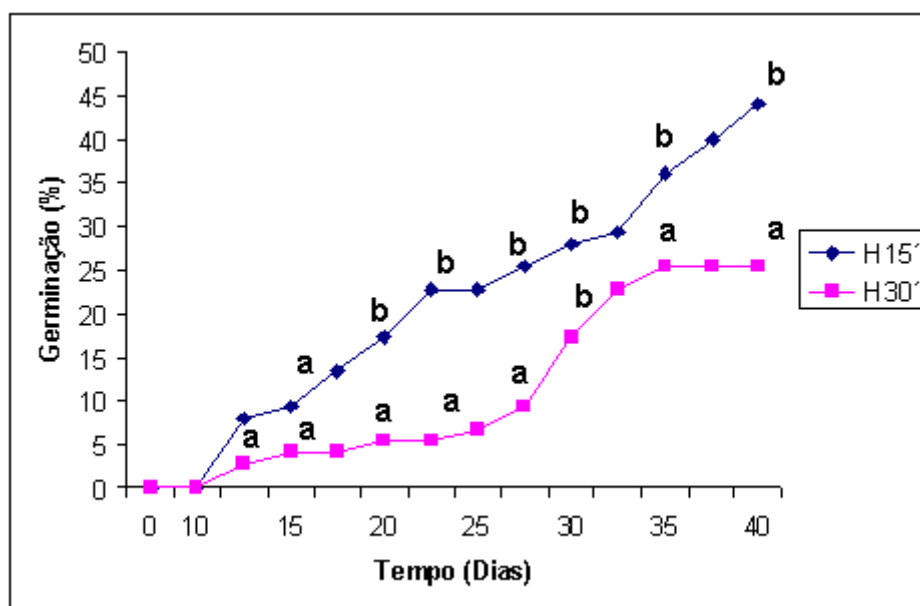


Figura 9. Porcentagem de germinação em função do tempo de sementes de *C. antisiphilitica* imersas em hipoclorito por 15 e 30 minutos. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos ao nível de 5% pelo teste t.

4.4.2. Germinação *in vitro*

Germinação *in vitro* das sementes de *C. antisiphilitica* desinfetadas por 20 minutos com solução de hipoclorito de sódio comercial contendo, 2% de cloro ativo. As sementes atingiram 25,78% de germinação (Figura 10).

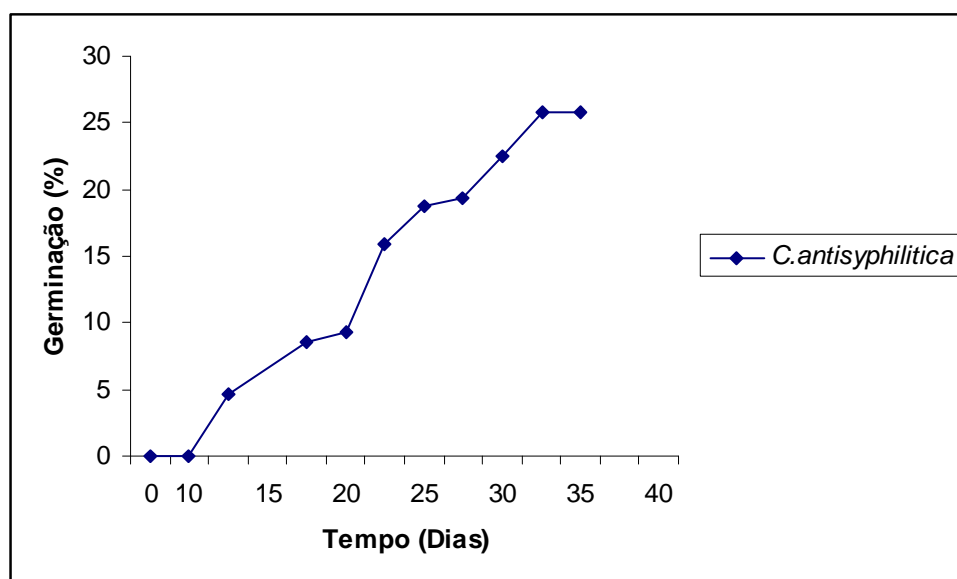


Figura 10. Porcentagem de germinação *in vitro* em função do tempo de sementes de *C. antisiphilitica* imersas em hipoclorito de sódio por 20 minutos.

4.4.3. Efeito de tipos de explantes e de concentrações de 2,4-D sobre a indução e o crescimento de calos

Observa-se, na Tabela 8, que calos foram induzidos com sucesso nos tipos de explantes utilizados, em ambas as concentrações de 2,4-D, sendo que as porcentagens de indução variaram de 74 a 100%.

Tabela 8. Efeito de tipos de explantes e de concentrações de 2,4-D sobre a indução de calos de *C. antisiphilitica* cultivados, por 6 semanas, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido.

Tipo de explante	2,4-D (mg/L) ^a	
	0,25	0,5
Nó foliar	74	92
Hipocótilo	100	77
Folha	77	88
Nó cotiledonar	93	77
Cotilédone	85	92

^aValores são porcentagens calculadas com base em pelo menos 12 repetições por tratamento.

Os resultados apresentados na Tabela 9 indicam que em 2,4-D 0,25 mg/L segmentos de cotilédones formaram calos com massa seca significativamente maior do que os demais explantes. Na presença de 2,4-D 0,5 mg/L o mesmo tipo de resultado foi verificado. Em ambas as concentrações os explantes que apresentaram calos com menor massa seca foram nó foliar e hipocótilo. Quando se compara o efeito das concentrações de 2,4-D, verifica-se que apenas para segmentos de cotilédones a concentração de 0,5 mg/L promoveu significativamente o aumento em massa seca dos calos, chegando a 25 mg por explante inoculado. Para os demais explantes a concentração de 2,4-D não afetou a massa seca dos calos.

Com relação ao teor de água dos calos observa-se que não houve diferença significativa entre os explantes, tanto a 0,25 mg/L como a 0,5 mg/L, variando de 96% a 97% e de 94% a 96%, respectivamente. Contudo, quando se compara as concentrações de 2,4-D verifica-se que os teores de água dos calos formados por todos os explantes em 2,4-D 0,5 mg/L foram

significativamente menores do que os detectados nos calos produzidos em 2,4-D 0,25 mg/L.

Após seis semanas, os calos apresentavam aspecto friável, com coloração variando de branca a amarelo claro e aspecto embriogênico, apresentado estruturas com aspecto globular (Figura 11).

Tabela 9. Efeito de tipos de explantes e de concentrações de 2,4-D sobre a massa seca e o teor de água de calos de *C. antisiphilitica* cultivados, por 6 semanas, em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido.

Tipo de explante	2,4-D (mg/L) ^a	
	0,25	0,5
	MS (mg)	
Nó foliar	9 Aa	6 Aa
Hipocótilo	9 Aa	7 Aa
Folha	12 Aa	15 Ba
Nó cotiledonar	11 Aa	13 Ba
Cotilédone	18 Ba	25 Cb
	Teor de água (% MF)	
Nó foliar	96 Aa	94 Ab
Hipocótilo	97 Aa	96 Ab
Folha	96 Aa	95 Ab
Nó cotiledonar	97 Aa	95 Ab
Cotilédone	97 Aa	95 Ab

^aMédias de no mínimo doze repetições seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si de acordo, respectivamente, com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$) e com o teste *t* de Student ($p \leq 0,05$). MF = massa fresca; MS = massa seca.



Figura 11. Indução de calos em explantes de *C. antisiphilitica* após seis semanas de cultivo em meio de cultura Murashige & Skoog, semi-sólido, suplementado com 2,4-D. 1-Folha, 2-Cotilédone, 3-Controle.

5. Discussão e Conclusão

As sementes de *C. antisiphilitica*, *T. impetiginosa* e *T. pentaphylla*, utilizadas no presente estudo apresentaram, antes do armazenamento, uma taxa média de umidade de 6,63%, 7,56% e 7,14%, respectivamente. Wielewicki et al. (2006) detectou teores de umidade equivalentes trabalhando com sementes de plantas do gênero *Tabebuia*: 8,3%, 9,0% e 9,2% para *T. alba*, *T. chrysotricha* e *T. heptaphylla*, respectivamente. Estes resultados sugerem que a maioria das espécies da família Bignoniaceae apresenta comportamento ortodoxo. As sementes ortodoxas caracterizam-se por se manterem viáveis após dessecação, até níveis de umidade em torno de 5%, e por poderem ser armazenadas sob baixas temperaturas, por um longo período (Carvalho, et al., 2006).

Neste tipo de sementes, o teor de água é um dos fatores mais importantes para a manutenção da sua viabilidade ao longo do tempo. A redução do teor de água causa diminuição da atividade metabólica das sementes, o que prolonga a viabilidade (Souza et al., 2005).

O armazenamento de sementes ortodoxas a -18°C é adotado pela maioria dos bancos de sementes, permitindo prolongar a longevidade das sementes por muitas décadas (Hellmann et al., 2006).

Após o armazenamento de sete meses em geladeira, observou-se um decréscimo no teor de água das sementes de *C. antisiphilitica* (6,17%), enquanto que as sementes conservadas em temperatura ambiente apresentaram aumento no teor de água (7,30%). A diminuição no teor de água, observada em sementes conservadas em geladeira, entretanto, não interferiu na viabilidade das mesmas, pois a maior taxa de germinação ocorreu neste tratamento (63,2%). A mesma tendência de decréscimo no teor de água, de 7,14% para 5,64%, após três meses de armazenamento em geladeira, foi observado em sementes de *T. pentaphylla*. Souza et al. (2005), também observaram queda no teor de água de sementes de *Tabebuia serratifolia*, após armazenamento em geladeira, passando de um teor de umidade inicial de 8% para 7% ao final do armazenamento. Este mesmo autor sugere que a tendência de queda no teor de água, com o passar do tempo, deve-se à menor umidade relativa do ar no ambiente de armazenamento, a geladeira.

As sementes de *T. impetiginosa* após oito meses de armazenamento apresentaram, ao contrário do esperado, aumento no teor de água, tanto quando conservadas em geladeira (9,25%) como em temperatura ambiente (10,28%). No entanto, para as sementes mantidas em temperatura ambiente o aumento no teor de água esteve relacionado com a perda total da viabilidade, o mesmo não ocorrendo com as mantidas em geladeira, que apresentaram 69,6% de germinação. Isso indica que aumento no teor de umidade, até 9,25% em *T. impetiginosa*, não foi suficiente para causar danos significativos às sementes, de forma a diminuir a viabilidade, enquanto que em *C. antisiphilitica* este efeito deletério do aumento no teor de umidade já ocorreu, de forma drástica, a 7,30%.

Para as sementes de *T. pentaphylla* não foram feitas avaliações nos teores de água, após o armazenamento em temperatura ambiente, mas o decréscimo na viabilidade, nesta condição, após 3 meses, 6 meses e 13 meses deve estar relacionado com o aumento no teor de água.

Mello e Eira (1995), trabalhando com sementes de ipês, observaram que as sementes de *T. avellanedae* armazenadas em temperatura ambiente, após

seis meses, perderam totalmente sua viabilidade, o que pode indicar uma tendência das espécies do gênero *Tabebuia* de sofrerem perda da viabilidade durante os primeiros seis meses de armazenamento, corroborando com os resultados obtidos para *T. impetiginosa* e *T. pentaphylla*. Em temperatura média de 25°C, temperatura ambiente, o metabolismo permanece em níveis elevados, e o processo de deterioração das sementes não é diminuído, o que pode ter acarretado esta queda na taxa de germinação das mesmas.

Já as sementes de *C. antisiphilitica* conservadas em temperatura ambiente por 7 meses não diferiram estatisticamente das sementes do controle, assim como sementes de outras Bignoniáceas, como *Jacaranda acutifolia* não perderam sua viabilidade até os seis meses, sendo que somente após esse período ocorrem quedas significativas das taxas de germinação (Mello e Eira, 1995). A condução de investigações complementares, para monitorar as alterações fisiológicas e citológicas do eixo embrionário e dos tecidos de reserva das sementes, através de estudos bioquímicos, citoquímicos e de microscopia eletrônica será de extrema importância para o entendimento do que ocorre com as sementes com o aumento do teor de umidade das mesmas.

Cunha *et al.* (1992) e Mello e Eira (1995) observaram que sementes de *Tabebuia* spp. podem ser armazenadas a longo prazo a -20°C, com manutenção da sua viabilidade. O mesmo foi observado no presente estudo, para as sementes de *C. antisiphilitica*, *T. impetiginosa* e *T. pentaphylla*, que mantiveram a viabilidade ao longo do armazenamento sob temperatura de -20°C, em freezer.

Segundo Cunha *et al.* (1992), o armazenamento em nitrogênio líquido oferece potencial para uma preservação sem limites de tempo, com a redução do metabolismo a níveis tão baixos que todos os processos bioquímicos são significativamente reduzidos e a deterioração biológica é virtualmente paralisada. Salomão (2002), estudando a exposição ao nitrogênio líquido de sementes de espécies tropicais observou que, espécies da família Bignoniaceae, como *Tabebuia aurea*, *T. impetiginosa*, *T. roseo-alba* e *T. serratifolia*, apresentam boas respostas à criopreservação, não diferindo estatisticamente das sementes controle. No presente trabalho, o fato das espécies *T. impetiginosa* e *T. pentaphylla* não terem apresentado diferenças

estatísticas entre as taxas de germinação das sementes conservadas em nitrogênio líquido, em nenhum dos tempos armazenados, e as das sementes mantidas em geladeira e freezer confirma a tendência observada para as demais espécies. No entanto, as sementes de *C. antisiphilitica* apresentaram significativa queda na taxa de germinação (20%), após conservação por sete meses em nitrogênio líquido, apesar de terem suportado a imersão por uma hora no nitrogênio líquido, sem perda de viabilidade. Como este resultado diferiu dos observados para outras espécies desta mesma família, estudadas neste trabalho, um novo teste de germinação foi realizado com outro lote de sementes conservadas em nitrogênio líquido por oito meses, sendo que o resultado confirmou novamente a queda na germinação das sementes. É possível que o armazenamento prolongado em nitrogênio líquido, para essa espécie, tenha causado alterações nas reservas das sementes ou no eixo embrionário (Coelho, 2006).

Com relação à eficiência do armazenamento em congelador os resultados apresentados nesse trabalho indicam que este tipo de armazenamento foi deletério para as sementes de *T. pentaphylla*, após três meses de armazenamento, mas não para as sementes de *C. antisiphilitica* e *T. impetiginosa*, que puderam ser conservadas nesta condição por 7 e 8 meses, respectivamente, sem apresentarem diferença em relação aos outros tratamentos eficientes, como freezer, geladeira e nitrogênio líquido (no caso de *T. impetiginosa*). Trabalhos com armazenamento de sementes em congelador são escassos, mas segundo Taiz e Zeiger (2004), a exposição repentina a temperaturas de 0°C de tecidos vegetais, denominada choque a frio, aumenta bastante às chances de dano do tecido. Estes mesmos autores indicam que o resfriamento mais rápido de células vegetativas pode evitar a formação de cristais de gelo grandes e de crescimento lento, que poderiam perfurar e destruir estruturas subcelulares. Os cristais de gelo que se formam durante o congelamento muito rápido são demasiado pequenos para provocar dano, o que pode justificar as maiores taxas de germinação nos tratamentos em que as sementes foram armazenadas em freezer e nitrogênio líquido, quando comparadas às obtidas quando o armazenamento ocorreu no congelador. Apenas estudos complementares mais aprofundados poderão elucidar a

natureza das modificações fisiológicas e citológicas que ocorrem quando as sementes são mantidas em congelador.

Os resultados obtidos neste trabalho sobre efeitos das condições de armazenamento das sementes das espécies estudadas são promissores, pois estimulam os estudos sobre os efeitos do nitrogênio líquido por períodos mais prolongados de armazenamento, no caso das espécies tolerantes. Da mesma maneira, apontam para a necessidade da condução de pesquisas posteriores, que permitam monitorar as modificações fisiológicas e ao nível celular sofridas pelas sementes, quando em condições que alteram a viabilidade.

Sobre a indução de calos em *C. antisiphilitica*, pode-se observar que o crescimento dos calos em massa seca foi influenciado pelo tipo de explante utilizado e pelas concentrações de 2,4-D. O fato da formação de calos não ter sido verificada no tratamento testemunha, desprovido de reguladores de crescimento, demonstra a forte dependência dos explantes da fonte exógena de auxina para promover os processos de desdiferenciação e ativação da divisão celular.

É interessante notar que os calos foram induzidos em todos os tratamentos, mas o crescimento posterior dos mesmos variou dependendo do explante. Isto porque, provavelmente, os explantes removidos de diferentes partes da plântula podem apresentar balanços endógenos de hormônios diferentes, que após a absorção de determinada quantidade do 2,4-D do meio de cultura, podem ter sido ajustados para níveis ótimos, capazes de sustentar as divisões celulares por períodos prolongados, promovendo maior acúmulo de massa seca. É o que deve ter acontecido com os segmentos de cotilédone em 2,4-D a 0,5 mg/L.

O fato dos explantes folha e cotilédone apresentarem as maiores massas secas está de acordo com os resultados obtidos por Santos et al. (2003), em experimentos realizados com explantes foliares de café (*Coffea arabica*), em que o uso da auxina 2,4-D, nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 mg/L, proporcionou, respectivamente, 61%, 67% e 69% de produção de calos. Concentrações superiores inibiram a produção de calos. Pasqual et al. (1998) também consideram essencial o uso de auxinas em concentrações reduzidas para promover a formação e crescimento de calos.

Thomas (2004), entretanto, em experimentos com *Kigelia pinnata*, espécie da mesma família dos Ipês, obteve como melhor resultado de indução de calos o explante nó foliar na concentração de 3 mg/L de 2,4-D, com 16,5% de indução.

Os explantes hipocótilo, nó cotiledonar e nó foliar apresentaram taxas de indução consideráveis, mas baixos valores de massa seca. É possível que neste caso o balanço endógeno final de hormônios no explante, após a absorção de 2,4-D tenha atingido níveis insuficientes ou acima do ótimo, inibindo a divisão celular e o crescimento dos calos. É provável que o crescimento de calos, a partir destes explantes, seja otimizada na presença de outros tipos de auxinas e até mesmo de outras concentrações de 2,4-D.

Os resultados sobre indução e crescimento de calos em *C. antisiphilitica*, apresentados neste trabalho, são relevantes, pois permitem a utilização das técnicas *in vitro* para a produção de biomassa, em futuros estudos sobre análise de metabólitos secundários. Além disso, permitem a utilização destes calos para desenvolver sistemas de regeneração de plantas e de embriogênese somática. Estes sistemas são importantes, respectivamente, para a geração de variabilidade genética e da produção, em larga escala, de mudas através de embriões somáticos.

6. Referências bibliográficas

Bewley, J.D., Black, M. **Seeds: Physiology of Development and Germination**. Plenum Press, 1994.

Brasil. Ministério do Meio Ambiente. **Avaliação e ações prioritárias para conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e campos Sulinos**. Brasília: MMA, 2000.

Cabral, E.L., Barbosa, D.C.A., Simabukuro, E.A. Armazenamento e germinação de sementes de *Tabebuia aurea* (Manso) Benth & Hook. F. Ex. S. Moore. **Acta Bot. Bras.** 17(4), 2003.

Coelho, R.R.P. Protocolo de criopreservação de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L. raça *latifolium* Hutch.) cultivares BRS 200 Marrom r BRS Verde, C 672p. Tese (Doutorado) CCA/UFPB, 2006.

Cunha, R., Salomão, A.N., Eira, M.T.S., Mello, C.M.C., Tanaka, D.M. Métodos para conservação a longo prazo de sementes de *Tabebuia* spp – Bignoniaceae. **Anais 2º Congresso Nacional sobre Essências Nativas.** 1992.

Capobianco, J.P.R. Mata Atlântica: Conceito, abrangência e área original. In **W.B. Schäffer & M. Prochuow orgs. A Mata Atlântica e você. Aprema v1. p.111-22, 2002.**

Carvalho, L.R., Silva, E.A.A., Davide, A.C. Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, 28 (2), p.15-25, 2006.

Degan, P., Aguiar, I.B., Sader, R., Perecin, D., Pinto, L. Influência de métodos de secagem na conservação de sementes de Ipê-branco. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, 5(3), 2001.

Gómez, K.A., Gómez, A. **Statistical Procedures for Agricultural Research.** Singapore; John Wiley & Sons, 660p., 1984.

Haines, R. **Biotechnology in forest tree improvement.** Rome: FAO, 230p., 1994.

Hellmann, M.E., Mello, J.I.O., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., Barbedo, C.J. Tolerância ao congelamento de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) influenciada pelo teor de água inicial. **Revista Brasil. Bot.**, 29 (1), p.93-101, 2006.

Hunt, R. Plant growth analysis. **Studies in Biology.** London, 1982.

Joly, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 4 ed. São Paulo. Ed. Nacional, 1977.

Joly, C.A., Leitão-filho, H.F. & Silva, S.M. O patrimônio florístico. In: **Mata Atlântica/Atlantic rain forest**. Ed. Index & Fundação S.O.S Mata Atlântica. **P.94-125**, 1991.

Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P.F. **Plant Systematics: A phylogenetic approach**, 1999.

Klein, R.M. Estrutura, composição, florística, dinamismo e manejo da “Mata Atlântica” (Floresta Ombrófila Densa) do sul do Brasil. **II Simpósio de ecossistemas da costa sul e sudeste brasileiros: Estrutura, função e manejo**. ACIESP, São Paulo. **V.1,p. 259-86 (Publicação ACIESP)**,1990.

Lorenzi, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, vol 1**. 4. ed Nova Odessa, SP ; Instituto Plantarum, 2002.

Lorenzi, H., Matos, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP; Instituto Plantarum, 2002.

Lorenzi, H., Souza, H. M., Torres, M. A. V., Bacher, L. B. **Árvores exóticas no Brasil: madeireiras, ornamentais e aromáticas**. Nova Odessa, SP; Instituto Plantarum, 2003.

Maeda, J.A. & Matthes, L.A.F. Conservação de sementes de Ipê. **Bragantia**, 1984.

Mello, C.M.C. & Eira, M.T.S. Conservação de sementes de Ipês. **Revista Árvore**, 19(4), 1995.

Murashige, T. Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, v.15, p. 473-97, 1962.

Myers, N. Threatened biotas: hotspots in tropical forests. **Environmentalist**, 8: 1-20, 1988.

Oliveira, A.K.M., Schleider, E.D., Favero, S. Caracterização morfológica, viabilidade e vigor de sementes de *Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth & Hook f.ex. S. Moore. **Revista Árvore**, 2006.

Pasqual, M., Ramos, J.D., Hoffmann, A., Carvalho, G.R. Meios de Cultura. In: Curso de pós-graduação Lato sensu (especialização) à distância: **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações**. Lavras: UFLA/FAEPE, 127 p., 1998.

Ramos, M.P.P., Ferreira, M.J.P., Lopes, L., Emerenciano, V.P. **Computer-aided Identification of Chemical Constituents Isolated from *Cybistax antisyphilitica***, 2003.

Reed, B.M., Schwank, S., Shala, R. Pear Seed retain Viability after Liquid Nitrogen Immersion. **Hortscience**, 36(6), p.1121-1122, 2001.

Rodrigues, A.M.S., Paula, J.E., Roblot, F., Fournet, A., Espíndola, L.S. **Larvicidal activity of *Cybistax antisyphilitica* against *Aedes aegypti* larvae**. Science Direct ; Fitoterapia, 2005.

Salomão, A.N. Tropical seed species' responses to liquid nitrogen exposure. **Braz. J. Plant Physiol**, 14 (2), p.133-138, 2002.

Santos, I.R.I. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 2001.

Santos, C.G., Paiva, R., Paiva, P.D.O., Paiva, E. Indução e Análise bioquímica de calos obtidos de segmentos foliares de *Coffea arabica* L. cultivar rubi. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras. V. 27, n. 3, p.571-77, maio/jun., 2003.

Souza, V.C. & Lorenzi, H. **Botânica Sistemática**. São Paulo: Plantarum, 2005.

Souza, V.C.S., Bruno, R.L.A., Andrade, L.A. Vigor de sementes armazenadas de ipê-amarelo *Tabebuia serratifolia* (Vahl.) Nich. **Revista Árvore**, 29 (6), p.833-841, 2005.

Taiz, L., Zeiger, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed Porto Alegre: Artmed, 2004.

Thomas, T.D. & Puthur, J.T. **Thidiazuron induced high frequency shoot organogenesis in callus from *Kigelia pinnata* L.** Acad. Sin. 45: 307-13, 2004.

Villela, F.A. & Peres, W.B. **Coleta, Beneficiamento e Armazenamento**, 2004.

Wielewicki, A.P., Leonhardt, C., Schilindwein, G., Medeiros, A.C.S. Proposta de padrões de germinação e teor de água para sementes de algumas espécies florestais presentes na região sul do Brasil. **Revista Brasileira de Sementes**, 28 (3), p.191-197, 2006.